

福井大学平成22年度重点研究「競争的配分経費（若手研究者支援）」 細胞ストレス時におけるエピジェネティックな 調節機構獲得メカニズムの解析

研究代表者： 沖 昌也（工学研究科・准教授）

概 要	我々は、実験に使用する出芽酵母の生存曲線を作成している過程で、通常 300Gy の照射で生存率 10% を切る酵母株に 2000Gy 照射しても生育可能な酵母株を分離した。そこで、この 2000Gy で生育した酵母に更にイオンビームを照射すれば生存率が低下すると予測したが、予想に反し生存率が約 4 倍上昇した。この耐性酵母株のうち 6 株に注目し更に解析を行った結果、高温感受性や低温感受性を示す酵母株が存在し、他のストレスにも影響があることが明らかとなった。その他、形態異常や、染色体異常も見られ、特に rDNA の存在する 12 番染色体の長さに変化が見られた。rDNA が細胞ストレス時のセンサー的役割を担っているという報告もあり、今後、rDNA のコピー数の変化と、耐性獲得機構との関与を明らかにしていく。また、遺伝学的解析により、情報が子孫まで受け継がれていることが明らかとなったが、少なくとも既知の DNA の修復に関与する遺伝子の 1 つとは一致しなかった。
関連キーワード	イオンビーム、エピジェネティクス、出芽酵母、サイレンシング、細胞ストレス

研究の背景および目的

細胞は同じ DNA のコピーを作り、分裂を繰り返すため、個々の細胞では全く同じ DNA 配列を持っている。それにも関わらず、規則正しく発生・分化し組織、器官ではそれぞれの特性を示す。この現象は「エピジェネティクス」と呼ばれ、同じ DNA 配列を持つ個々の細胞間での遺伝子の発現状態が異なっており、同様なメカニズムが世代を超えて子孫にも伝わるということが明らかとなっている。これら DNA 配列に依存しない調節機構が子孫に正確に伝わることから、「細胞記憶」とも表現される。

我々は、出芽酵母をモデル生物として用い、様々な視点からエピジェネティクスに関して研究を進めてきた。現在までに、出芽酵母全遺伝子の中から、エピジェネティックな遺伝子発現調節に関わる遺伝子を同定し、また様々な変異株も取得して

いる。更に単一細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現変化追跡システム、細胞死直前の細胞分離方法等も確立し、エピジェネティックな現象解明に向けて多方面から解析を行って来た。本申請では、細胞がストレスを得たときにだけ記憶され、ストレスが回避されたときにはその調節機構を失うような「一時的なエピジェネティクス」の存在有無を明らかにする目的で研究を行った。このような、状況に応じたエピジェネティクスの存在が証明出来れば、細胞機能の多様性、生物の環境適応能力など、従来までの研究でブラックボックスとなっていた現象解明に貢献出来ると考えている。また、現在までに報告されていない、生物の持つ新たな機能の発見に繋がることが期待される。

研究の内容および成果

我々は、実験に使用する出芽酵母株の生存曲線を作成する目的で、通常 300Gy のイオンビームを照射すれば生存率 10% を切る酵母に、2000Gy という高線量を照射した。すると予想に反し、生存率 0.01% を切るような究極な状況下においても生育する酵母が存在した（図1 参照：図では 1000Gy までの生存曲線を示した）。イオンビームは照射範囲内においては均一に当たるのも 1 つ特徴であるため、この生育した酵母は、様々な変異が導入されているが、ぎりぎりの状態で運良く生き残った酵母と考えるのが一般的である。そこで、更にイオンビームを照射すれば、より放射線への感受性が高まり、致死率が上がると予測し実験を行ったところ、予想に反し、300Gy 照射では生存率が約 4 倍上昇し、更に照射すると約 1.5 倍上昇した（図2）。

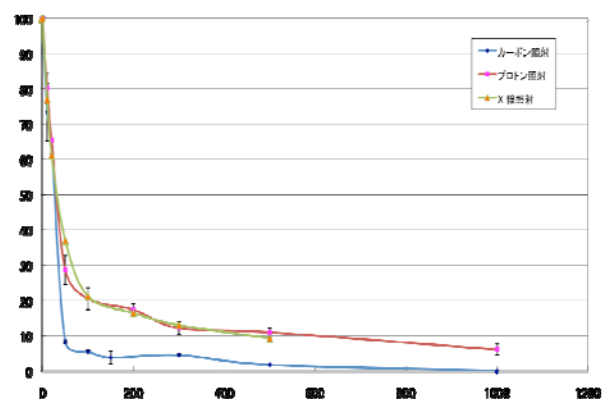


図1：異なる放射線の生存率の比較

この結果は、究極の状態でのみ働く生物の死を回避する新たな機能の存在、同時に、この機能は細胞記憶が世代を超えて継承されるというエピジェネティクスコントロールの可能性を示唆した。

放射線照射による酵母株の生存率に対する影響

プロトンビーム、カーボンビーム、X 線を酵母に照射し生存率を測定した結果、照射する放射線による生存率の違いを見出した(図 1)。また、異なるバックグラウンドの酵母を用いると、上記放射線の生存率の影響に違いが見られた。

ストレス耐性酵母の分離

高線量のイオンビーム (2000Gy) を照射し、耐性酵母を獲得した(図 2)。シングルコロニーアイソレーションを行い、6 つの酵母の表現型を解析した。増殖曲線を作成したところ、2 つの酵母株において増殖速度が低下していた。また、1 株が高温感受性を、異なる 1 つの酵母株が低温感受性を示した。また、顕微鏡により形態を観察したところ 1 つの酵母株において形態異常が見られた。更に、パルスフィールド電気泳動を行ったところ、染色体異常などが見られ、特に、rDNA の存在する 12 番染色体の長さが変化していた。

ストレス耐性獲得時に変化するタンパク質の同定

照射していない酵母株と、2000Gy 照射後の酵母株からタンパク質を回収し、2 次元電気泳動により照射前後で変化するタンパク質の同定を試みた。多数のタンパク質が変化していることが分かったが、現状ではまだ絞り切れていないため、今後更に解析を続ける予定である。

細胞記憶の追跡

遺伝学的解析により、耐性獲得メカニズムは遺伝子レベルでの影響か、エピジェネティックな調

節機構かを明らかにすることを目的に実験を行った。具体的には異なる性の酵母株と掛け合わせを行い、子孫に遺伝情報が伝わっていくか解析した。その結果、2 : 2 で分離し、情報は子孫にまで受け継がれていることが明らかとなった。また、異なるバックグラウンドで生存率に影響が見られた酵母株は既知の DNA の修復に関与する遺伝子の 1 つに変異が入っていることが知られている。そこで、この遺伝子の変異に依存しているか、PCR 法、制限酵素切断を併用し解析した。その結果、DNA の変異には依存しないことが明らかとなった。

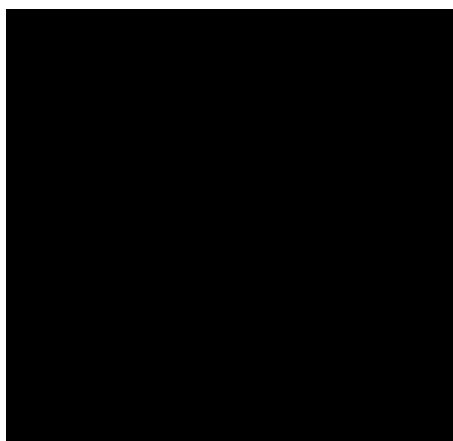


図 2. 複数回照射による生存率の違い
左からプロトンビーム 2000Gy 照射、カーボンビーム 2000Gy 照射、プロトンビーム 2000Gy 照射後プロトンビーム 300Gy 照射、カーボンビーム 2000Gy 照射後カーボンビーム 300Gy 照射、カーボンビーム 2000Gy を 2 回照射後プロトンビーム 300Gy 照射した際の生存率を表す。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」3 件

- (1) Sun J et al., (2011) Genes Genet. Sys. (in press)
- (2) Maeda Y et al., (2010) Acta. Cryst. F. 66, 1064-1066.
- (3) Mizutani T et al., (2010) J.Biol.Chem. 285, 28240-28251.

「特記事項」

(招待講演) 国外 1 件、国内 3 件
(学会発表) 国外 1 件、国内 16 件
(特許出願) 3 件

(受賞) 2010 年 日本遺伝学会奨励賞

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- (1) 科学技術振興機構 (JST) ・戦略的創造研究推進事業・さきがけ・H21～H24・「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの

解明」・代表・採択・40,000(千円)

- (2) 日本学術振興会・科学研究費補助金・基盤研究 (B) ・H23～H27・「生体内においてヘテロクロマチン領域が揺らぐことの重要性」・代表・申請中
- (3) 日本学術振興会・科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究・H23～H25・「放射線により変化するエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解明」・代表・申請中
- (4) 文部科学省・新学術領域研究・公募研究・H23～H24・「外的要因により変化したヘテロクロマチン領域伸長メカニズムの解明」・代表・申請中